







GENE ASSOCIATING OPEN-ANGLE GLAUCOMA INCLUDING NORMAL OCULAR TENSION GLAUCOMA**Publication number:** WO0188120**Publication date:** 2001-11-22**Inventor:** HATTORI YUKIO (JP); SUZUKI RYO (JP)**Applicant:** TSUBOTA LTD (JP); HATTORI YUKIO (JP); SUZUKI RYO (JP)**Classification:****- international:** **C12Q1/68; C12Q1/68;** (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68**- european:** C12Q1/68M6**Application number:** WO2001JP04067 20010516**Priority number(s):** JP20000144492 20000517**Also published as:** JP2002306165 (A)**Cited documents:** WO9951779
 WO9832850
 WO0042220
 XP002946916
 XP002946917**Report a data error here****Abstract of WO0188120**

Polynucleotides having substitution of thymine (T) by cytosine (C) at the -153 position of myocilin gene are identified as glaucoma-associated gene. To detect these polynucleotides, use can be made of primers of SEQ ID NOS:3 to 6 and probes of SEQ ID NOS:7 and 8. Also, kits with the use of the primers of SEQ ID NOS:3 to 6 or the probes of SEQ ID NOS:7 can be provided. Use of these kits makes it possible to detect normal ocular tension glaucoma and open-angle glaucoma at a much higher frequency than in a case with the use of glaucoma-associated genes reported hitherto. Also, these kits are usable in screening glaucoma in patients with a fear of hereditary glaucoma or asymptomatic carriers. Moreover, it becomes possible for the first time to diagnose open-angle glaucoma including normal ocular tension glaucoma prior to the onset.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/88120 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/68 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04067 (72) 発明者: 服部幸夫 (HATTORI, Yukio) [JP/JP]; 〒754-0002 山口県吉敷郡小郡町大字下郷1234-3 Yamaguchi (JP). 鈴木 亮 (SUZUKI, Ryo) [JP/JP]; 〒755-0067 山口県宇部市小串267 Yamaguchi (JP).
(22) 国際出願日: 2001 年 5 月 16 日 (16.05.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 弁理士 奥山尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂三丁目2番12号 赤坂ノアビル8階 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
特願2000-144492 2000 年 5 月 17 日 (17.05.2000) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 有限会社 坪田 (TSUBOTA, LTD.) [JP/JP]; 〒273-0031 千葉県船橋市西船5丁目26番7号 Chiba (JP).

[続葉有]

(54) Title: GENE ASSOCIATING OPEN-ANGLE GLAUCOMA INCLUDING NORMAL OCULAR TENSION GLAUCOMA

(54) 発明の名称: 正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の関連遺伝子

(57) Abstract: Polynucleotides having substitution of thymine (T) by cytosine (C) at the -153 position of myocilin gene are identified as glaucoma-associated gene. To detect these polynucleotides, use can be made of primers of SEQ ID NOS:3 to 6 and probes of SEQ ID NOS:7 and 8. Also, kits with the use of the primers of SEQ ID NOS:3 to 6 or the probes of SEQ ID NOS:7 can be provided. Use of these kits makes it possible to detect normal ocular tension glaucoma and open-angle glaucoma at a much higher frequency than in a case with the use of glaucoma-associated genes reported hitherto. Also, these kits are usable in screening glaucoma in patients with a fear of hereditary glaucoma or asymptomatic carriers. Moreover, it becomes possible for the first time to diagnose open-angle glaucoma including normal ocular tension glaucoma prior to the onset.

(57) 要約:

緑内障に関連する遺伝子として、ミオシリン遺伝子の-153位においてチミン(T)をシトシン(C)に置換したポリヌクレオチドが同定された。これらのポリヌクレオチドを検出するために、配列番号3～6のプライマー、配列番号7～8のプロープを用いることができる。さらに、配列番号3～6のプライマーまたは配列番号7～8のプロープを使用したキットを提供できる。これらのキットにより、従来報告された緑内障関連遺伝子よりはるかに高頻度に正常眼圧緑内障および開放隅角緑内障が検出できる。遺伝性が心配される家系や未発症キャリアーであることが心配される患者においては、緑内障のスクリーニングとしても使用することができる。正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障を発症前に診断することも初めて可能となる。

WO 01/88120 A1



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の関連遺伝子

技術分野

本発明は、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障に関連する遺伝子に関する。本発明は、さらに、緑内障関連遺伝子を検出するためのプライマー又はプローブ、緑内障関連遺伝子を検出するためのキット、緑内障の発症前診断キット、および緑内障の予備的検出方法に関する。

背景技術

緑内障は、我が国を初め欧米の大きな失明原因の1つで、日本では、40才以上の3%以上に正常眼圧緑内障を含む緑内障が見出されている。現在、日本では約200万人、全世界では約8000万人もが緑内障に罹患している。先進国全体の統計では、失明原因の2位であり、しかも高齢化に伴い、その割合は益々増加している(Quigley, H.A., N. Engl. J. Med. 1998; 338: 1063-1064を参照)。

緑内障は、一般的には眼圧が健常眼圧より高まることにより、視神経組織の血液循環が阻害され、視神経線維が消耗、脱落、変性することにより生じる。緑内障はまず視野に異常が生じ、進行するとついには失明に至ることもある重篤な眼疾患である。日本では、正常眼圧緑内障が多いことが特徴で、いわゆる高眼圧緑内障の3倍以上の患者が存在する。

緑内障治療には早期の発見が重要である。現在、緑内障の検査には、眼圧、視野、および視神経乳頭、視神経線維などの眼底検査を複数回行う必要がある。しかし、緑内障の眼圧は短時間でも変動するため、正常眼圧緑内障の診断には眼圧測定を一日かけて行うなど時間と労力を要する。また健眼が患眼の視野を補うため、患者は症状が進行していても緑内障に気付かないことが多い。

緑内障には様々なタイプがあるが、近年、原発性開放隅角緑内障(primary open-angle glaucoma, POAG)に関連する遺伝子が同定されている。この遺伝子は、第一染色体長腕上に位置し、若年性開放隅角緑内障遺伝子(GLCL1A)として報告さ

れ、ミオシリン(myocilin; MYOC)という54kdのタンパク質をコードする (Stone, E.M.ら、Science 1997; 275: 668-670を参照)。

緑内障に関連するミオシリン遺伝子の多くの突然変異は、幾つかの研究グループにより報告されている (例えば、Stone, E. M.ら、Science 1997; 275: 668-670、Rozsa, F. W.ら、Mol. Vis. 1998; 4: 20、Kubota, R.ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 1998; 242: 396-400、Williams-Lyn, D.ら、Can. J. Ophthalmol. 2000; 35: 12-17を参照)。このような突然変異のほとんどは、エキソンに生じる。若年性開放隅角緑内障には、学会発表されたものを含めて22個のアミノ酸変異が確認されている。しかし、それら既知の全てを合計しても、開放隅角緑内障の約3%を説明できるにすぎない (Alward, W. L. ら、N. Engl. J. Med. 1998; 338: 1022-1027、Z. Zhouら、Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 2221-2228を参照)。ミオシリンのエキソンには、5つの異なる対立遺伝子が日本の患者について同定されている (鈴木ら、Am. J. Hum. Genet. 1997; 61: 1202-1204を参照) が、これらの対立遺伝子の頻度も極めて少ない。

プロモーター領域の突然変異としては、-83位におけるグアニン(G)からアデニン(A)への置換が報告されている (Fingert, J. H.ら、Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 899-905を参照)。しかし、この突然変異は多型性に過ぎず、疾患特異性は極めて低い。また、多数の患者のいる正常眼圧緑内障については、遺伝子の検索すらも全く行われていなかった。さらに、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域における突然変異については、多型性の報告はあるものの、全くといってよいほど研究が進んでいなかった。このように、報告されたミオシリン異常は緑内障のごく一部を検出できるに過ぎない (Williams-Lyn, D.ら、Can. J. Ophthalmol. 2000; 35: 12-17、Pang, C. P.ら、Hum. Mutat. 2000; 15: 122を参照)。

緑内障では、眼圧、視野及び眼底の臨床診断と点眼治療が発達してきた。しかし、現在の医学では、進行した緑内障の視機能を回復させることは困難である。

そこで、現在自覚症状がないが緑内障に罹っている人、または将来に緑内障に罹る可能性の高い人をそのような可能性の低い人と区別できれば、緑内障の早期発見及び予防及び治療が効果的になされるはずである。

さらに我が国に多い正常眼圧緑内障は、眼圧が正常で自覚症状がないため、眼

科を受診しても見逃されることが多い。この正常眼圧緑内障に関する遺伝子の報告はない。

発明の開示

本発明者らは、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障患者のミオシリン遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を、健常人の当該部分の塩基配列と比較し、開放隅角緑内障患者のプロモーター領域の特定の位置に、有意な頻度で突然変異が生じていることを見出した。

本発明に係る遺伝子は、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域に存在し、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の中では検出頻度が著しく高い。この点で本願遺伝子は、上述の公知の突然変異とは明らかに異なっている。緑内障は40才を越えて発症することが多いが、初期に確定診断をすることは極めて困難である。

したがって、本発明で初めて明らかになったプロモーター領域における突然変異を調べることで、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の発症の可能性の高い人を見い出す補助的な診断的役割を果たすことができる。そして、この突然変異を有する人々に対して定期的な検診を行うなどして、緑内障の早期発見の努力を行える可能性がある。

また、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障に関連するこの突然変異遺伝子の有無を調べることで、緑内障に罹りやすい形質が子孫に遺伝しているかどうかの推測も可能となる。また、以下に説明するように、本発明に係る緑内障に関連する遺伝子は、従来報告された緑内障関連遺伝子より、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の患者の中ではるかに高い発症頻度を示すことを我々は見いだしている。

すなわち、本発明は、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障患者がミオシリン遺伝子のプロモーター領域に高頻度で有する、配列番号1で表されるDNA配列を含むポリヌクレオチドに関する。

なお、本明細書では、一般に「オリゴヌクレオチド」と呼ばれるものを含む広い意味で「ポリヌクレオチド」という用語を用いることとする。

また、本発明は、配列番号2で表されるヒトのミオシリン遺伝子上流のDNA配列における-153位のチミン(T)がシトシン(C)で置換されているポリヌクレオ

チドの一部または全部を含むポリヌクレオチドであって、少なくとも-153位の塩基を含むポリヌクレオチドに関する。配列番号2は、ヒトのミオシリン遺伝子の-473位～3位の塩基配列を示したものである。

ここで、塩基の位置は、DNAにおいて、翻訳開始点を1位とし、その上流の隣接する塩基を-1位として、-1位の塩基を含めてn塩基分だけ上流、即ち、5'末端側に位置する塩基の位置を-n位という。例えば、-153位とは、ペプチド合成開始点から153塩基分だけ上流に位置するDNAにおける塩基の位置である。

なお、ミオシリン遺伝子の-153位がチミン(T)からシトシン(C)に置換された上記ポリヌクレオチドは、-153位以外の位置において、1個若しくは数個の塩基が欠失、付加または置換されていてもよい。

また、本願発明は、ミオシリン遺伝子の上流域全てを含むもののみならず、-153位を含むものであれば、必要に応じ、任意の長さの断片が可能である。例えば、塩基長が19～316bpであるポリヌクレオチドを例示することができる。

また、本発明は、上述のポリヌクレオチドを増幅するために用いられるプライマーに関する。プライマーは、目的とするポリヌクレオチドが増幅される限り、任意の塩基の長さ及び配列を有するものを使用できる。好適には、配列番号3ないし配列番号6のプライマーを用いることができる。また、配列番号3のプライマーと、配列番号4～6のいずれかのプライマーとからなる一組のプライマーを使用することができる。

さらに、本発明は、上記プライマーを含む、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するためのキットに関する。また、そのようなプライマーを含む、緑内障を発症する前に緑内障に罹る可能性の高い人を診断するためのキットをも提供することができる。これらのキットにより、正常眼圧緑内障を含む緑内障の診断に苦慮する例や同疾患の遺伝を心配する人に対して補助的な診断を担う。

さらに、本発明は、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位がシトシン(C)であるものを検出できる、配列番号7で表されるプローブ、及び、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位がチミン(T)であるものを検出できる、配列番号8で表されるプローブに関する。これらのプローブは、5'末端をピオ

チン、蛍光又は³²Pで標識したものが好ましい。これらのプローブを使用して、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位がチミン(T)であるものと、シトシン(C)であるものを区別することが可能である。

また、本発明は、配列番号7及び配列番号8で表されるプローブを含む、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するためのキットに関する。また、そのようなプローブを含む、緑内障を発症する前に緑内障に罹る可能性の高い人を診断するためのキットをも提供することができる。これらのキットにより正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障に罹患する可能性が高い人に対して補助的な診断を担う。

さらに、本発明は、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域のDNA配列における-153位のチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出することを特徴とする緑内障に罹患する可能性の高い人の検出方法に関する。

本発明のプライマー、プローブ、又はキットを用いることにより、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位の塩基における突然変異を検出できる。以下の調査結果に基づいて説明するように、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位の塩基におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換は、緑内障、特に、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障と密接に関連している。緑内障が発見されたとき、その子孫や家系内の人々が、類似の遺伝子変異を有しているか否かを調べることにより、発症前診断（即ち、緑内障に将来罹患するかどうか）が実施可能になる。このような突然変異を検出することにより、緑内障患者の早期発見と、緑内障に罹る可能性の高い人を高い精度で検出することができる。次世代の子孫は、年齢が若く、緑内障の発症年齢に達しておらず、未発症キャリアーなのか生涯発症しない健常人であるのかの見極めは、現在の臨床的手法のみでは不可能であるからである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、緑内障に関連する突然変異を有するポリヌクレオチドに関する。本発明により検出できる緑内障には、正常眼圧緑内障及び開放隅角緑内障とが含まれる。本発明の緑内障に関連する遺伝子は、具体的には、配列番号1で表されるDNA配列を含んでなるポリヌクレオチド、及び、配列番号2で表されるヒトの

ミオシリン遺伝子上流のDNA配列における-153位のチミン(T)がシトシン(C)により置換されたポリヌクレオチドの一部または全部を含むポリヌクレオチドであって、少なくとも-153位の塩基を含むポリヌクレオチドに関するものである。

本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖DNA、およびその相補鎖からなる二本鎖DNA、アンチセンス鎖を含み、一部に修飾塩基を有するものをも含む。また、-153位以外の位置において、1個若しくは数個の塩基が欠失、付加または置換されているものをも含む。

このようなポリヌクレオチドは、緑内障、特に正常眼圧緑内障及び開放隅角緑内障の原因遺伝子の1つである。したがって、このようなポリヌクレオチドを有するか否かを調べるためのプライマー、プローブ及びキットは、緑内障患者及び緑内障に罹る可能性の高いグループ、及び、緑内障の子孫への遺伝を調べる遺伝子診断に用いることが可能である。

また、本発明のプライマーとしては、ミオシリン遺伝子の-153位の上流及び下流の配列の一部と実質的に相補的なプライマー対であればよく、特に限定されない。ここで、「実質的に相補的」とは、ミオシリン遺伝子の-153位の上流及び下流の配列とアニーリングできる程度に相補的であればよいことを意味する。例えば、プライマーの5'末端、または3'末端、または5'末端と3'末端の両端にミオシリン遺伝子の一部と相補的でない配列を含むプライマーであっても、ミオシリン遺伝子とアニーリングできる限り、本発明のプライマーに含まれるものとする。また、非特異的な増幅を防ぐためや、適当な制限酵素認識部位を導入するために、ミオシリン遺伝子と相補的でないミスマッチ配列を持つプライマーを使用することができる。

好適なプライマーの例としては、配列番号3ないし配列番号6のいずれか一以上のプライマーが挙げられる。配列番号3のプライマーと、配列番号4から6のいずれかのプライマーとからなる1組のプライマーを使用してPCR等によりミオシリン遺伝子の-153位を含むポリヌクレオチドを増幅することができる。

ミオシリン遺伝子の-153位のチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出する方法は、とくに限定されず、例えばサンガー(Sanger)法などにより、塩基配列を決定することによって検出しても良いし、RFLP(Restriction Fragment Length

Polymorphism)のように、配列を決定することなく間接的に検出してもよい。RFLPに用いることのできる制限酵素としては、SmaIを例示できる。

さらに、ポリヌクレオチドを増幅するための本発明のプライマーを用いて、PCR(Polymerase Chain Reaction)、およびPCR-RFLP(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)、PCR-SSO(PCR-Specific Sequence Oligonucleotide)、PCR-SSCP(PCR-Single Strand Conformation Polymorphism analysis)、アレルト異的PCR(allele-specific PCR)の様な方法で、ミオシリン遺伝子の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出することができる。

また、本発明のプロープを用いてドットプロットハイブリダイゼーション(dot blot hybridization)などにより、ミオシリン遺伝子の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出することができる。配列番号7のプロープにより、-153位がシトシン(C)であるミオシリン遺伝子を検出でき、配列番号8のプロープにより、-153位がチミン(T)であるミオシリン遺伝子を検出できる。

上記に示したミオシリン遺伝子の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出する方法のうち、PCR、PCR-SSCP、PCR-RFLP、ドットプロットハイブリダイゼーション、アレルト異的PCRの概要を以下に説明する。

PCR:

dNTPを加えた反応緩衝液にプライマーを添加し、さらに、耐熱性DNAポリメラーゼを添加して、変性、アニーリング、伸長のサイクルを繰り返して、-153位を含むミオシリン遺伝子を増幅する。反応緩衝液は、例えば、10mMのTris-Cl(pH8.9)、1.5mMのMgCl₂、80mMのKCl、0.5mg/mlのBSA、0.1%のコール酸ナトリウム(Na cholate)、0.1%のTriton X-100を含む緩衝液などを使用することができるが、この反応緩衝液に限定されるものではなく、任意の反応緩衝液を使用できる。変性、アニーリング、伸長のサイクルは、一般的には、変性に94℃で30秒～1分30秒、アニーリングに55～68℃で30秒～1分30秒、伸長に72℃で30秒～5分で25～40サイクル行うが、この範囲に限定されるものではない。例えば、変性に94℃で1分、アニーリングに62℃で1分、伸長に72℃で2分で25～40サイクル行うことができる。

使用する耐熱性DNAポリメラーゼは、TaqポリメラーゼやTthポリメラーゼなど、市販の耐熱性ポリメラーゼを使用できる。

プライマーは、すでに説明したように、ミオシリン遺伝子の-153位の上流及び下流の配列の一部と実質的に相補的なプライマー対を用いることができる。当業者は、使用するプライマーの長さ、プライマーの相補性、又は下記に説明する種々のPCRの変法に応じて、反応緩衝液、反応条件、プライマーを適宜選択し、目的とする配列のみを増幅することができる。

PCR-SSCP:

-153位を挟むような1組のプライマーを用いたPCRにより増幅を行う。得られた断片を変性し、ポリアクリルアミド電気泳動における泳動度の違いにより、-153位における配列の相違を検出できる。PCR-SSCPに用いるプライマーとしては、配列番号3及び配列番号4のプライマーを使用することができる。

PCR-RFLP法:

配列番号3と配列番号5のプライマーを使用してPCRを行うと、得られる185bpのPCR断片は、-153位がチミン(T)からシトシン(C)へ置換しているミオシリン遺伝子については、-154~-149位がCCCGGGとなり、-153位が置換されていないミオシリン遺伝子については、-154~-149位がCTCGGGとなる。CCCGGGの配列のみが、制限酵素SmaIで認識され、切断されるため、CCCGGGを有するPCR後の185bpの断片をSmaIで処理すれば、163bpの断片と22bpの断片が生じることとなる。したがって、PCR後の185bpの断片をSmaIで処理し、163bpの断片の有無をポリアクリルアミドゲル電気泳動又はアガロースゲル電気泳動により検出することによって、-153位において、チミン(T)からシトシン(C)へ置換しているか否かを判断できる。

アレル特異的PCR(Allele-specific PCR):

-153位を挟むような1組のプライマーのうち、一方のプライマーを-153位に対応する部分が3'末端側にくるように設計して、-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を有するミオシリン遺伝子上流配列を検出できる。このような1組のプライマーとしては、配列番号3と配列番号6のプライマーを例示できる。

配列番号6のプライマーは、非特異的増殖を防ぐため、プライマーの3'末端

から4塩基目のシトシン(C)をアデニン(A)としたミスマッチが設けられている。このような1組のプライマーを用いて、-153位がシトシン(C)に置換しているもののみが増幅されるように、厳密なPCR条件下で入れ子PCR(nested PCR)、即ち、配列番号3と配列番号4のプライマーを用いてPCRで増幅した断片を鋳型として、配列番号3と配列番号6のプライマーを用いてさらにPCRを行うのが好ましい。配列番号3と配列番号6のプライマーを用いた場合には、最終的には、-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を有するミオシリン遺伝子上流配列のみが増幅され、185bpのPCR増幅断片が得られる。この断片をアガロースゲル電気泳動又はポリアクリルアミド電気泳動で検出することができる。

ドットプロットハイブリダイゼーション:

例えば配列番号3と配列番号4を用いて増幅した-153位を含むPCR断片を、変性後、ナイロン膜などにスポットする。膜をプレハイブリダイゼーション緩衝液(例えば5×デンハート液(Denhardt's)、5×SSC、0.1%SDS、0.1mg/ml変性ニシン精子DNAを含むもの)でインキュベートした後、5'末端がビオチン、³²P、蛍光などで標識された配列番号7と配列番号8のプローブを加えて、さらにインキュベートする。膜を洗浄した後にオートラジオグラフィー、アルカリフォスファターゼによる発色、化学発光、あるいは蛍光でハイブリダイゼーションが生じたか否かを検出する。当業者は、非特異的なハイブリダイゼーションを防ぐために、ハイブリダイゼーションの温度や洗浄条件を変更選択することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーションの温度として40~50度で2時間程度を例示でき、洗浄にテトラメチルアンモニウム塩化物を用いる等を例示することができる。

配列番号7のプローブとハイブリダイゼーションが検出された場合は、-153位において、チミン(T)からシトシン(C)への置換を有するミオシリン遺伝子であると判断し、配列番号8のプローブとのみハイブリダイゼーションが検出された場合は、-153位においてチミン(T)からシトシン(C)への置換のないミオシリン遺伝子であると判断する。

本発明のキットは、ミオシリン遺伝子の-153位を含むミオシリン遺伝子のプロモーター領域を増幅できるプライマー又は-153位の塩基の相違を区別して特異的にハイブリダイゼーションできるプローブを含む。キットに含まれる試薬として

は、塩基の置換を検出する方法により適宜変更可能である。例えば、サンガー法により塩基配列を決定して行う場合は、ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP及びdATP、dTTP、dCTP、dGTP、DNA合成酵素などを、プライマーの他に含む。RFLPにより塩基の置換を検出する場合は、適当な制限酵素、例えばSma Iを含むものを挙げることができる。

さらに、本発明のキットには、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するために適当な緩衝液、洗浄液を含むものであってもよい。

なお、本発明の緑内障の発症前診断キットは、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するためのものであり、上記キットを有効成分とするものである。本発明の緑内障の発症前診断キットにより、緑内障の早期の発見及び治療に有用である。

本発明により置換の有無を検出されるDNAは、ヒトの毛髪、血液、体液、唾液、培養細胞、切除された組織などから得ることができ、特に限定されない。

以下に実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらにより本発明を制限するものではない。

実施例

正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障を有する日本人の患者を対象に、下記のような第一及び第二の調査を行った。検査の対象としたのは、総計で緑内障の家族歴を有する正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障患者83人と、眼科を受診していないので眼疾患を持たないと考えられた健常人101人である。両群ともに年齢などの構成は同様である。

具体的には、次のような方法を用いた。緑内障(POAG)の患者83例の末梢血白血球よりNaI法(Wang L., et al: Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. Nucleic Acid Res., 22: 1774-1775, 1994)によりDNAを抽出した。また、対照として、健常人101例について同遺伝子異常を分析した。ミオシリン遺伝子の正常塩基配列の情報は、GenBankの寄託番号AB006686, AB006686S2, AB006686S3より得た。

(1)PCR:

0.5mlのマイクロチューブに、H₂Oを15.5 μ l、1.25mMのdNTPを4 μ l、10 \times 反応緩衝液(100mMのTris-Cl(pH8.9)、15mMのMgCl₂、800mMのKCl、5mg/mlのBSA、1%のコール酸ナトリウム、1%のTriton X-100)を2.5 μ l、配列番号3及び配列番号4で表される2種類の50pmol/ μ lのプライマーを各0.5 μ l、DNAを1 μ l(約0.5 μ g)を加えてよく混和し、1U/ μ lのTth DNAポリメラーゼ(Toyobo)1 μ lを加え、ミネラルオイル1滴を重層した。サーマルサイクラー(ASTEC PC-700)を用いて、ミオシリン遺伝子のプロモーター領域を以下の条件で増幅させた。

原則として、繰り返し前の熱変性は、94 $^{\circ}$ Cで1分とし、続くサイクルは変性に94 $^{\circ}$ Cで1分、アニーリングに62 $^{\circ}$ Cで1分、伸長に72 $^{\circ}$ Cで2分(最終回4分)で30回行った。但し、RFLP用の断片は、配列番号3と配列番号4のプライマーを用いてPCRを行って増幅された断片を1000倍希釈して鋳型とし、ミスマッチプライマーである配列番号5で表されるプライマーと、配列番号3で表されるプライマーと間の入れ子PCRにより増幅した。

(2)単鎖構造多型性(SSCP: single strand conformation polymorphism):

配列番号3及び配列番号4で表されるプライマーを用いて得られるPCR断片3 μ lに、90%ホルムアミド(20mMのEDTA、0.1%のBPB、0.1%のキシレンシアノール)を1 μ l混ぜ、90 $^{\circ}$ Cで5分熱変性後、氷上にて急冷した。これを37 $^{\circ}$ C、300Vの条件下で4時間かけて12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ゲル厚:0.35mm、ゲル用緩衝液:0.112Mトリス-0.112M酢酸(pH6.4)、外槽用緩衝液:0.025Mトリス-0.088Mグリシン(pH8.8)の不連続緩衝系)を行った後、銀染色した。

(3)PCR-RFLP:

RFLP用に、入れ子PCRで得られた増幅断片(185bp)をアルコール沈殿により精製後、SmaI(Toyobo, Osaka, Japan)により37 $^{\circ}$ Cで6時間の加水分解を行った。その後、0.114Mのトリス-ホウ酸(2mMのEDTAを含む)のpH8.3緩衝液中で8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、臭化エチジウム染色により、-153位においてシトシン(C)が置換した配列に特異的な163bpの断片の有無を検索した。

(4)塩基配列の決定:

SSCPでの異常バンドを各々のPCR条件で再増幅させ、DEAEペーパーでDNAを抽出精製した後、オートシーケンサー(ABI 373A)で塩基配列を決定した。

開放隅角緑内障を持つ日本の患者のこのスクリーニングの結果は、以下の通りである。エキソンとイントロンの境界におけるイントロンは、異常を有さない。しかし、プロモーター領域に3つの異常を見出した。1つは、-83位におけるグアニン(G)からアデニン(A)の多型である。これらは、すでにAlward, W. L.ら (N. Engl. J. Med. 1998; 338: 1022-1027) により報告されている。

二番目の異常は、-339から-314位におけるGTリピートの新しい突然変異であった。これらは、統計的に多型性だと考えられる。

ところが三番目の異常として、プロモーター突然変異である-153位のチミン(T)からシトシン(C)への突然変異が新たに観察された。

このチミン(T)からシトシン(C)への置換は、CAGCCCCACのタンデムリピートを生じる。しかもγグロビン遺伝子の発現に関わることが知られているCACCCモチーフが、この二つのリピートである[5' CAGCCCCAC]C[CAGCC(T→C)CAC]を連結する。それ故、この突然変異はミオシリン遺伝子の発現に影響を与える可能性が考えられた。

この突然変異は、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の約20%という極めて多数の患者に検出された。この高頻度は、遺伝子研究の中では、疾患に関係する単一の変異としては特筆されるべき数字である。この発見の経緯は、本発明を特許申請する動機となった最も重要なものなので、詳細を実験に従って以下に記す。

表に示すとおり、第一の調査では、本遺伝子は緑内障の17%にみられたが、対照群の中にも7.9%に変異がみられ、第一回の調査では統計的に有意な差はなかった。

ところがその第一の調査において、-153位にシトシン(C)を有する3人（下記の表において*で表す）を眼科的に調べた結果、驚くべきことに、3人全員が正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障を有していた。すなわち、この健常人と考えられていた3人は、眼科的な自覚症状はなかったが、すでに進行した緑内障か、初期の緑内障の患者であった。したがって、実際には、患者群は、33名中8名（24.2%）で、健常人は35名中0名（0%）であった。即ち、-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換は、緑内障を検出するのに非常に有望な単一の遺伝子異常であることが強く示唆された。

これらの結果から、我々は、-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換について、新たな対象として、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障の患者53人と、患者の年齢に対応させた健常人63人について第二の調査を行った。

第二の調査では、第一の調査結果と同様に、-153位のチミン(T)からシトシン(C)への突然変異が多くの患者で検出され、対照である健常人と患者との間で有意な差を生じた($p < 0.01$, Fisherの直接確率計算法による)。第一の調査結果と第二の調査結果とを合わせた場合でも、患者と健常人との差は明白である(表)。-153位においてチミン(T)がシトシン(C)に置換したもののホモ接合体は検出されなかった。

表によれば、第一回及び第二回の調査をあわせて、変異は患者群の16名と対照群の6名であった。対照群の第二回の調査の3名は眼科検査を行っていないので緑内障であるか否かは不明である。しかしながら、-153位においてチミン(T)からシトシン(C)への置換が検出された第一回の調査における8人と、第二回の調査における患者群の11人のあわせて19人は、正常眼圧緑内障ないし開放隅角緑内障であった。患者には最高眼圧が30mmHg以下のものがほとんどであるという特色があった。

正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障におけるミオシリンのプロモーター異常

突然変異	父母由来の 各染色体で の(GT)リピ ート数	患者群 (変異のあった人数/ 調査人数)(%)	対照群 (変異のあった人数/ 調査人数)(%)
-83 G→A		9/30	14/36
(GT)n	n=13/13	13/30 (43)	22/33 (67)
	13/15	13/30 (43)	7/33 (21)
	15/15	4/30 (13)	3/33 (9.1)
	11/11	0/30 (0)	1/33 (3.0)
-153 T→C	第一の調査	5/30 (17)	3*/38 (7.9)
	第二の調査	11/53 (21)	3**/63 (4.8)
			(p<0.01)
	合計	16/83 (19)	6***/101 (5.9)
			(p<0.01)

*:この3名は、対象群に属していたが、実際には全員が緑内障であり、実際には0/38(0%)である。

**:眼科検査を行っていない。

***:この対照群の6名中、3名は明らかな緑内障であり、残りの3名は緑内障か、非緑内障であるかの検査を行っていないので不明である。

なお-83G→Aは、-83位におけるグアニン(G)からアデニン(A)への置換を意味し、(GT)nの欄のnは、GTのリピート数を表わす。-153T→Cは-153位におけるチミン(T) からシトシン(C)への置換を意味する。(GT)nは統計的に考えて多型性である。

表の結果から、-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への突然変異は、緑内障との関連が明らかである。この突然変異は、第1の調査、第2の調査および総計でも、常に共通して、開放隅角緑内障患者の約20%に見出された。

-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への突然変異と緑内障患者において、

これほどの高い一致率は、以前報告されている若年性開放隅角緑内障に関連する突然変異でも、エキソン、イントロン、プロモーター全てを含め、今まで報告されていない。

予備的な調査では、プロモーター活性は、-153位におけるチミン(T)とシトシン(C)の対立遺伝子では明らかに異なり、さらに、このプロモーター活性の変化は、この突然変異の160ヌクレオチド上流にあるGTのジヌクレオチドの繰り返し数との連鎖に関係していることが示唆された。

この-153位がシトシン(C)である対立遺伝子は、我々の研究で初めて見出され、正常眼圧緑内障を含む開放隅角緑内障に関連する主要な突然変異である。この遺伝子は正常眼圧緑内障及び若年性開放隅角緑内障における従来の報告より著しく検出頻度が高い。

子孫への遺伝を心配する患者や家系内に緑内障患者を有しているため未発症キャリアーのおそれがある若い人々にとっては、本願遺伝子は発症が臨床的に検出できない場合のスクリーニングにも有用である。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、緑内障患者の早期発見と、緑内障に罹る可能性の高い人を従来の遺伝子の報告にない高い精度で検出することができる。特に、我が国では患者数が多く、自覚症状が少ない正常眼圧緑内障について、遺伝子診断も初めて可能となる。本発明の遺伝子に基づいて、眼圧や視野の測定など時間と労力のかかる複数回の複雑な検査を行う前に、あるいはそのような検査と並行して、正常眼圧緑内障を含む緑内障患者及び家系内で緑内障に罹る可能性の高いグループを検出することができる。また、罹患者の遺伝の心配について答えるためには、本発明の緑内障診断キットあるいは方法を用いて、たとえ眼科的に発症が確定できない段階でも、希望があれば本願の緑内障関連遺伝子を有しているかどうか調べ、緑内障に関連した形質が遺伝しているかどうかを推定できる点でも有益である。

請求の範囲

1. 配列番号1で表されるDNA配列を含むポリヌクレオチド。
2. 配列番号2で表されるヒトのミオシリン遺伝子上流のDNA配列における-153位のチミン(T)がシトシン(C)へ置換されているポリヌクレオチドの一部または全部を含むポリヌクレオチドであって、少なくとも-153位の塩基を含むポリヌクレオチド。
3. -153位以外の位置において、1個若しくは数個の塩基が欠失、付加または置換された請求項2に記載のポリヌクレオチド。
4. 塩基長が19～316bpである請求項2または3に記載のポリヌクレオチド。
5. 請求項1～4のいずれかーに記載のポリヌクレオチドを増幅するために用いられるプライマー。
6. (i)配列番号3のプライマーと、
(ii)配列番号4、配列番号5及び配列番号6からなる群から選択される一以上のプライマーと
からなる1組のプライマー。
7. 請求項5又は請求項6のプライマーを含む、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するためのキット。
8. 請求項5又は請求項6のプライマーを含む、緑内障の発症前診断キット。
9. ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位がシトシン(C)であるものを検出するための配列番号7で表されるプローブ。
10. ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位がチミン(T)であるものを検出するための配列番号8で表されるプローブ。
11. 配列番号7及び配列番号8で表されるプローブを含む、ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域の-153位におけるチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出するためのキット。
12. 配列番号7及び配列番号8で表されるプローブを含む、緑内障の発症前診断キット。

13. 緑内障が正常眼圧緑内障である請求項8又は12に記載の緑内障の発症前診断キット。

14. ヒトのミオシリン遺伝子のプロモーター領域のDNA配列における-153位のチミン(T)からシトシン(C)への置換を検出することを特徴とする緑内障に罹患する可能性の高い人の検出方法。

SEQUENCE LISTING

<110> TSUBOTA Ltd.,
HATTORI, Yukio
SUZUKI, Ryo

<120> A Glaucoma Related Gene and its Application for
Detecting Open-Angle Glaucoma including Normal Tension
Glaucoma

<130> 1184PCT

<140>

<141>

<150> JP P2000-144492

<151> 2000-05-17

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagccccacc cagccccac

19

<210> 2

<211> 476

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gatctccagt tcttagcata gtgcctggca cagtgcaggt totcaatgag tttgcagagt 60
gaatggaaat ataaactaga aatatacct tgttgaaatc agcacaccag tagtcttggt 120
gtaagtgtgt gtacgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt aaaaccaggt ggagatatag 180
gaactattat tggggtatgg gtgcataaat tgggatgttc tttttaaaaa gaaactccaa 240
acagacttcc ggaaggttat tttctaagaa tottgctggc agcgtgaagg caacccccct 300
gtgcacagcc ccaccagcc tcacgtggcc acctctgtct tccccatga agggctggct 360
ccccagtata tataaacctc tctggagctc gggcatgagc cagcaaggcc acccatccag 420
gcacctctca gcacagcaga gotttccaga ggaagcctca ccaagcctct gcaatg 476

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

gtaaaaccag gtggagatat aggaac

26

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ttgcagaggc ttggtgaggc ttcct

25

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

ggaagacaga ggtggccacc c

21

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ggaagacaga ggtggccaca tgg

23

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 7

accagcccc acgtg

15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 8

accagcctc acgtg

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	SUZUKI R. et al., "Promoter mutations of myocilin gene in Japanese patients with open angle glaucoma including normal tension glaucoma", Br. J. Ophthalmol., September, 2000, Vol.84, No.9, page 1078	1-14
A	Diliana S. et al., "Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma", J. Med. Genet., (1998), Vol.35, pages 989 to 992	1-14
A	WO 99/51779 A2 (The University of Iowa Research Foundation), 14 October, 1999 (14.10.99), & AU 9934798 A & EP 1070143 A2	1-14
A	WO 98/32850 A1 (The Regents of the University of California), 30 July, 1998 (30.07.98), & AU 9858204 A & NO 9903653 A & EP 1012271 A1 & US 6171788 B1 & MX 9906976 A1 & NZ 336860 A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 August, 2001 (13.08.01)

Date of mailing of the international search report
28 August, 2001 (28.08.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04067

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 00/42220 A1 (The Regents of the University of California), 20 July, 2000 (20.07.00), & AU 200026057 A	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/04067

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/09, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	SUZUKI R. et al. Promoter mutations of myocilin gene in Japanese patients with open angle glaucoma including normal tension glaucoma. Br. J. Ophthalmol., Sep. 2000, Vol. 84, No. 9, p. 1078.	1-14
A	Diliana S. et al. Novel TIGR/MYOC mutations in families with juvenile onset primary open angle glaucoma. J. Med. Genet., 1998, Vol. 35, pp. 989-992.	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.08.01	国際調査報告の発送日 28.08.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 木村 順子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/51779 A2 (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 14. 10月. 1999 (14. 10. 99) & AU 9934798 A & EP 1070143 A2	1-14
A	WO 98/32850 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30. 7月. 1998 (30. 07. 98) & AU 9858204 A & NO 9903653 A & EP 1012271 A1 & US 6171788 B1 & MX 9906976 A1 & NZ 336860 A	1-14
P, A	WO 00/42220 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20. 7月. 2000 (20. 07. 00) & AU 200026057 A	1-14